绿盲蝽气味结合蛋白 AlucOBP7 的表达及气味结合特性

纪 萍[1], 刘靖涛[1,2], 谷少华[1], 朱晓强[1], 张永军[1,*], 郭予元[1]
(1. 中国农业科学研究院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193;
2. 山东农业大学植物保护学院, 山东泰安 271018)

摘要: 气味结合蛋白(odorant binding proteins, OBPs) 在昆虫嗅觉识别中起着重要的作用, 尤其是在运输外界脂溶性气味分子通过嗅觉感器淋巴液到达嗅觉受体(olfactory receptors, ORs)的过程中发挥关键作用。明确 OBPs 在昆虫同外界进行信息交流过程中的作用有利于阐明昆虫嗅觉识别的机制, 同时可为利用干扰昆虫嗅觉识别来进行害虫防治奠定理论基础。本研究克隆了一个绿盲蝽 *Apolygus lucorum* (Meyer-Dür)气味结合蛋白 AlucOBP7 基因(GenBank 登录号: JQ675724), 并进行了原核表达, 以 1-NPN 为荧光探针采用荧光竞争结合实验研究了 AlucOBP7 蛋白和 10 种棉花挥发物及 6 种性信息素类似物的结合能力。结果表明: 在 10 种棉花挥发物中, AlucOBP7 能够和 2-己酮及水杨酸甲酯有效结合, 结合常数分别为 55.13 μmol/L 和 28.26 μmol/L。在 6 种盲蝽性信息素类似物中, 4-氧代-反-2-己烯醛和 AlucOBP7 具有较强的结合能力, 结合常数为 23.14 μmol/L。丁酸乙酯、丁酸丁酯及己酸己酯也能够和 AlucOBP7 有效结合, 但结合能力中等, 结合常数分别为 30.58, 39.26 和 35.81 μmol/L。初步推测, AlucOBP7 可能是绿盲蝽性信息素结合蛋白(pheromone binding proteins, PBPs), 并在感受性信息素和植物挥发物的过程中发挥双重功能。

关键词: 绿盲蝽; 气味结合蛋白; 性信息素; 原核表达; 荧光竞争结合; 结合常数
中图分类号: Q966 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2013)06-0575-09

Expression and binding specificity analysis of odorant binding protein AlucOBP7 from *Apolygus lucorum* (Hemiptera: Miridae)

JI Ping[1], LIU Jing-Tao[1,2], GU Shao-Hua[1], ZHU Xiao-Qiang[1], ZHANG Yong-Jun[1,*], GUO Yu-Yuan[1]
(1. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China)

Abstract: Odorant binding proteins (OBPs) are widely involved in olfactory perception and play a key role in transporting hydrophobic odorants across the sensillum lymph to the olfactory receptors (ORs). Understanding the roles of insect OBPs in chemical communication would help us elucidate the mechanism of insect olfaction perception and lay the theoretical basis for controlling the target pests by interfering with insect chemoreception. In this study, a novel OBP gene *AlucOBP7* (GenBank accession no.: JQ675724) was identified from the green plant bug, *Apolygus lucorum* (Meyer-Dür), and then the recombinant AlucOBP7 was prokaryotically expressed in *Escherichia coli* and purified. Fluorescence competitive binding assays were conducted to explore the binding properties of AlucOBP7 with 10 cotton volatiles and 6 sex pheromone analogs using a fluorescence probe, N-phenyl-1-naphthylamine (1-NPN). The results revealed that for the 10 cotton volatiles, AlucOBP7 showed certain binding abilities with 2-hexanone and methylis salicylas, with the dissociation constants of 55.13 μmol/L and 28.26 μmol/L, respectively. For the 6 sex pheromone analogs, the AlucOBP7 had a strong binding affinity with 4-oxo-(*E*)-2-hexenal, with the dissociation constant of 23.14 μmol/L. Ethyl butyrate, butyl butanoate and hexyl hexanoate showed moderate binding abilities with AlucOBP7, and their dissociation constants were 30.58, 39.26 and 35.81 μmol/L, respectively. We so inferred that AlucOBP7 may be a pheromone binding protein of the green plant bug and play dual roles in the perception of sex pheromone and plant

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目(2012CB114104); 国家自然科学基金项目(31071694, 31272048)
作者简介: 纪萍, 女, 1988 年生, 硕士研究生, 研究方向为昆虫化学生态学, E-mail: jiping.ad@163.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: yjzhang@ippcaas.cn
收稿日期 Received: 2013-03-21; 接受日期 Accepted: 2013-05-26

volatiles.

Key words: *Apolygus lucorum*; odorant binding proteins; sex pheromone; prokaryotic expression; fluorescence competitive binding; dissociation constant

昆虫在长期进化过程中，其灵敏的嗅觉能够感受外界挥发性化学信息物质来实现寻求食物、配偶和产卵场所等行为(Larsson *et al.*, 2004; 谷少华等, 2010; Gu *et al.*, 2011)。昆虫的嗅觉器官主要为头部前端的触角，其触角上分布着数量和种类众多的感受器，而感受器中遍布着各种嗅觉相关功能蛋白，包括气味结合蛋白(odorant binding proteins, OBPs)、化学感受蛋白(chemosensory proteins, CSPs)和嗅觉受体(olfactory receptors, ORs)等。其中 OBPs 是一类低分子量(15 kD 左右)且偏酸性的水溶性蛋白，主要存在于昆虫嗅觉感器内胞外空间的淋巴液中。典型 OBPs 结构包括 6 个保守的半胱氨酸(Krieger and Breer, 1999)，这 6 个半胱氨酸分别交叉形成 3 个二硫键(Cys Ⅰ-Cys Ⅲ, Cys Ⅱ-Cys Ⅴ, Cys Ⅳ-Cys Ⅵ)，这 3 个二硫键对 OBPs 蛋白的三维结构起支撑作用(Pelosi *et al.*, 2006)。在鳞翅目昆虫中，根据氨基酸序列的相似性和表达部位的不同，OBPs 被分为 3 种亚型: PBPs (pheromone-binding proteins), GOBPs (general odorant binding proteins), ASPs (antennal specific proteins) 或 ABPx (antennal-binding protein) (Krieger *et al.*, 1996; Robertson *et al.*, 1999)。自从利用同位素标记配体结合实验发现第一个昆虫 OBP 以来(Vogt and Riddiford, 1981)，多种盲蝽的 OBPs 被鉴定(Gu *et al.*, 2011; Ji *et al.*, 2013)，但对于其蛋白的功能尚不十分明确，主要是由于昆虫触角较小，从中分离纯化蛋白很困难，尤其是对于结构和性质很相似的几种 OBP 蛋白，难以将它们完全分开(Vogt and Riddiford, 1981; Nagnan-Le Meillour *et al.*, 1996; Vogt *et al.*, 1999;)。近年来，随着分子生物学技术的发展，利用基因表达的方法使这方面的研究成为可能(Feng and Prestwich, 1997; Maibèche-Coisne *et al.*, 2001; Krieger *et al.*, 2005; Prestwich, 2008)，为进一步解析昆虫 OBPs 的生化特性和生理功能提供了很好的技术支撑。

昆虫气味结合蛋白与脂溶性的气味物质发生作用，是昆虫专一性识别外界气味物质的第一步生化反应(Vogt and Riddiford, 1981)，气味结合蛋白在这个复杂的过程中充当了运送和卸载信息化合物的载体，对于昆虫与外界进行信息交流具有重要意义。有报道指出，当缺失表达一个相关的 OBP 基因后，红火蚁 *Solenopsis invicta* 种群会产生多个蚁后，表明这个 OBP 蛋白在红火蚁感受蚁后的性信息素中起着重要作用(Krieger and Ross, 2002)。OBPs 一个很重要的假设功能是特异性地结合小分子化合物，而荧光竞争性结合实验能够检测气味结合蛋白和化学感受蛋白与气味或其他化学信息物质识别结合的特性(Ban *et al.*, 2003)。在蚜虫的 3 个 OBPs 与 12 个配体化合物竞争性结合实验中，只有蚜虫报警素(*E*)-β-farnesene 和 farnesol 能够显著与 OBP3 结合(Qiao *et al.*, 2009)。

绿盲蝽 *Apolygus lucorum* (Meyer-Dür)属于半翅目(Hemiptera)盲蝽科(Miridae)的后丽盲蝽属，是一类重要的棉花害虫，寄主植物有 100 多种。近年来，随着 Bt 棉的大面积推广和种植，棉田害虫的生态地位发生了演替，棉铃虫等鳞翅目害虫得到了有效地控制，而盲蝽等一些刺吸式害虫逐渐上升为主要害虫(Wu *et al.*, 2002; Wu, 2007)。由于绿盲蝽具有食性杂、繁殖快、善迁飞及天敌控制作用弱等特点，化学防治效果不尽人意。目前，有关盲蝽科昆虫信息素类似物的研究已有一些报道。有报告指出，丁酸己酯和丁酸反-2-己烯酯可能是美国牧草盲蝽性信息素主要组分(Gueldner and Parrott, 1978)。张涛(2011)对绿盲蝽 *Apolygus lucorum*、中黑盲蝽 *Adelphocoris suturalis*、三点盲蝽 *Adelphocoris fasciaticollis* 和苜蓿盲蝽 *Adelphocoris lineolatus* 的性信息素进行了初步鉴定，发现其主要组分都为 4-氧代-反-2-己烯醛、丁酸己酯和丁酸反-2-己烯酯，只是比例上存在差异。为明确绿盲蝽嗅觉识别过程，并利用嗅觉行为干扰策略来达到控制绿盲蝽等危害的目标，我们克隆、表达并且纯化了一个新的绿盲蝽气味结合蛋白，命名为 AlucOBP7。室内利用荧光竞争结合实验测定了 AlucOBP7 与 10 种棉花挥发物及 6 种盲蝽性信息素类似物的结合能力，以期为深入探索绿盲蝽嗅觉信息感知及传递的生理行为机制提供理论参考。

1　材料和方法

1.1　供试昆虫

绿盲蝽于 2011 年采自中国农业科学院廊坊科

研中试基地试验田，在保鲜盒内用新鲜的四季豆饲养。养虫室环境条件为 29 ± 1℃，相对湿度 60% ± 5%，光照 14L∶10D（Lu *et al*.，2007）。

1.2　试剂

Trizol、反转录试剂盒 SuperScript™ Ⅲ First-stand Synthesis System for RT-PCR 购自 Invitrogen 公司，pGEM-T Easy 载体购自 Promega 公司，胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自 Axygen 公司，限制性内切酶、DNA 连接酶、ExTaq DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司，重组肠激酶 Recombinant Entherokinase 购自 Novagen 公司，表达感受态菌株 BL21（DE3）购自天根生化科技有限公司，荧光探针购于 Sigma 公司，气味标样分别购于 Sigma 公司和梯希爱（上海）化成工业发展有限公司。

1.3　触角总 RNA 提取及 cDNA 合成

取羽化后 3 d 的雌雄绿盲蝽成虫触角各 100 对，液氮研磨后用 Trizol 提取触角总 RNA，提取的总 RNA 置于 －80℃保存备用。采用 SuperScript Ⅲ 逆转录合成系统合成第一链 cDNA，合成的第一链 cDNA 保存于 －20℃或直接进行下一步实验。上述操作均按照操作说明书执行。

1.4　PCR 扩增

绿盲蝽气味结合蛋白 AlucOBP7 基因序列为本实验室通过筛选绿盲蝽触角 cDNA 文库获得（GenBank 登录号 JQ675724）（Ji *et al*.，2013），依据 AlucOBP7 序列设计特异性表达引物，正向引物：5′-CCATGGCTGAAGAACAAGCCAA-3′；反向引物：5′-GGATCCTCAGAAATCTGGCGGA -3′。为了便于将目的基因克隆到表达载体上，在正向、反向引物中分别设计了 *Nco* Ⅰ，*Bam*H Ⅰ 酶切位点（下划线表示）。PCR 反应条件：95℃预变性 2 min；94 ℃变性 30 s，56℃退火 30 s，72℃延伸 1 min，35 个循环；最后 72℃延伸 10 min。扩增完毕后用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。利用琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒回收 PCR 产物，PCR 产物经胶回收后克隆于 pGEM-T Easy 载体上，重组克隆载体 pGEM/AlucOBP7 转化 DH5α 感受态细胞，放入 LB 液体中（含 Amp）培养过夜，次日提取质粒，采用菌液 PCR 和 *Nco* Ⅰ，*Bam*H Ⅰ 双酶切验证重组载体 pGEM/AlucOBP7 插入片段的正确性。

1.5　AlucOBP7 蛋白表达和纯化

对重组质粒 pGEM/AlucOBP7 和表达载体 pET-30a(＋) 分别使用 *Nco* Ⅰ 和 *Bam*H Ⅰ 进行双酶切，酶切产物分别进行电泳回收。回收后的基因片段和载体使用 T4 DNA 连接酶 16℃连接 16 h，转化感受态菌株 DH5α，37℃过夜培养后，挑取单菌落进行菌落 PCR 鉴定，将测序正确的载体转化表达感受态菌株 BL21（DE3）。经过 37℃过夜培养，挑取单菌落进行 PCR 鉴定，阳性菌落待用。挑取酶切和测序鉴定正确的单克隆于 5 mL LB 中（含 Kan 100 μg/mL）培养过夜，次日以 1∶100 的比例（v/v）转接到新鲜的 LB 液体培养基中，37℃ 200 r/min 振荡培养至 OD_{600} 值达到 0.4～0.6，此时加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L。为了增加蛋白在上清中的表达量，对诱导条件进行了优化，包括 IPTG 的浓度、诱导时间、诱导温度及诱导转速等。将诱导好的 AlucOBP7 大肠杆菌菌液，离心弃掉上层溶液后，加入裂解缓冲液（80 mmol/L Tris-HCl，200 mmol/L NaCl，1 mmol/L EDTA，4% 甘油，0.5 mmol/L PMSF，pH 7.2）充分重新悬浮菌体后超声破碎，分别取上清和包涵体进行 SDS-PAGE 电泳检测。离心取上清至 HisTrap 亲和层析柱，用不同浓度咪唑溶液进行洗脱，并收集洗脱液进行 SDS-PAGE 分析，检测目的蛋白所在收集管的位置。最后蛋白用超滤管（Millipore，截留分子量为 10 kD）浓缩至 1 mg/mL。为避免 His-tag 标签对重组蛋白 pET/AlucOBP7 功能产生影响，实验中采用重组肠激酶 Recombinant Entherokinase 切去 His-tag，切割条件为 30℃切割 16 h，随后用 HisTrap 亲和层析柱对 AlucOBP7 进行再纯化，获得不含 His-tag 的重组蛋白 AlucOBP7 于 －80℃ 保存备用。

1.6　荧光竞争结合实验

实验在 F-380 型荧光分光光度计（中国天津）上进行，所用容器为 1 cm 宽的石英杯，狭缝宽度为 10 nm。增益值为 1，灵敏度为 2。荧光探针 1-NPN 溶于甲醇，终浓度为 1 mmol/L。测定荧光探针 1-NPN 和 AlucOBP7 的结合常数时，设定激发光波长为 337 nm，扫描的发射光波长范围为 390～500 nm。向荧光比色皿中加入 50 mmol/L Tris buffer（pH＝7.4），然后向比色皿中加入 AlucOBP7 蛋白使其终浓度为 2 μmol/L，待荧光强度稳定 15 s 后扫描并记录发射光谱，然后顺序向比色皿中加入荧光探针 1-NPN，使 1-NPN 溶度从 2 μmol/L 递增到 16 μmol/L。重复测定 3 次。利用 Scatchard 方程计算 AluOBP/1-NPN 的结合常数。

气味分子和 AlucOBP7 蛋白的结合能力测定步骤如下：在荧光比色皿中加入 50 mmol/L Tris 缓冲液（pH 7.4），然后加入 AlucOBP7 和荧光探针 1-

NPN，终浓度都为 2 μmol/L，待荧光强度稳定后，记录最大荧光强度。将溶于甲醇的气味标样(1 mmol/L)逐次加入到荧光比色皿中，浓度从 2 ~ 16 μmol/L 递增，记录荧光强度变化情况。每次实验重复 3 次。假设 AlucOBP7 蛋白的活性为 100%，且在饱和状态下蛋白与气体分子的结合比为 1∶1，根据 IC_{50} 值(AlucOBP7/1-NPN 复合物的荧光强度值下降一半时配基气味分子的浓度)计算气味标样与蛋白的结合常数(Ki)。公式为 $Ki = [IC_{50}]/(1 + [1\text{-}NPN]/K_{1\text{-}NPN})$，其中[1-NPN]为未结合的 1-NPN 的浓度，$K_{1\text{-}NPN}$ 为 AlucOBP7/1-NPN 的结合常数。

2 结果与分析

2.1 序列分析与进化树构建

我们对 GenBank 登录的 AlucOBP7 基因序列进行了分析。结果表明，AlucOBP7 基因读码框 ORF 全长 438 bp，编码 145 个氨基酸，应用 SignalP3.0 Server 软件(http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)进行信号肽预测，N-末端疏水区包含由起始位置开始的 18 个氨基酸组成的信号肽，预测分子量大小为 13.78 kD，等电点为 5.07(http://web.expasy.org/compute_pi/)。该蛋白具有气味结合蛋白的一些典型特征，如序列中含有 6 个高度保守的半胱氨酸(图 1)。

采用 Blast 程序对绿盲蝽气味蛋白基因序列进行同源性搜索，应用 Mega5.0 软件通过邻接法(Neighbour-Joining)对包括 AlucOBP7 和与之同源性相对较高的其他 15 种昆虫的气味结合蛋白序列运算 1 000 次获得系统进化树。从系统进化树上可以看出 AlucOBP7 和苜蓿盲蝽 AlinOBP1 位于同一分支上(图 2)，并且 DNAMAN6.0 软件比对结果显示其氨基酸序列相似性达到 74.02%，表明这两个基因可能来源于同一个祖先基因，后来在不同的选择压下发生分化并各自行使着自己的功能。

2.2 AlucOBP7 重组蛋白的表达和纯化

我们对 AlucOBP7 表达的条件进行了优化，最佳诱导条件为：IPTG 浓度为 1 mmol/L，温度为 28℃，诱导时间为 6 h，诱导转速为 200 r/min。在此条件下 AlucOBP7 获得大量表达。SDS-PAGE 电泳结果显示位于 19 kD 左右有特异性蛋白条带，和预期基本一致，而未诱导的 pET/AlucOBP7 转 BL21(DE3)的菌液在相应的位置没有产生特异性条带(图 3)。将诱导后的菌体经过超声波破碎后，分离上清和包涵体，SDS-PAGE 结果表明 AlucOBP7 蛋白在上清和包涵体中都有大量表达。利用 HisTrap 亲和层析柱纯化上清液中的蛋白，经脱盐柱脱盐后，超滤管浓缩 AlucOBP7 蛋白浓度为 1 mg/mL。随后用重组肠激酶切去了 His-tag，得到无标签的重组蛋白 AlucOBP7，SDS-PAGE 检测到位于 14 kD 左右出现单一条带(图 3)。

2.3 AlucOBP7 蛋白气味结合特性

通过 Scatchard 方程可计算出复合物 AlucOBP7/1-NPN 的结合常数为 6.56 μmol/L(图 4)。室内采用荧光竞争结合实验测定了 10 种棉花挥发物(Loughrin *et al*., 1994；于惠林等，2007；潘洪生等，2010)及 6 种盲蝽性信息素类似物(Gueldner and Parrott，1978)标样(表 1)和 AlucOBP7 重组蛋白的结合能力。结果表明，10 种棉花挥发物中的乙酸叶醇酯、β-蒎烯、橙花叔醇、

```
  1 ATG AAC CCA CTC ATT CTC ATA CTG TTG GTA GTA TTT GCT GCT GCG ACG AGG GGA GAA GAA
    M   N   P   L   I   L   I   L   L   V   V   F   A   A   A   T   R   G   E   E
 61 CAA GCC AAC GCC TTG GTA GCC AAA GCT TTC AAC AAA TGC TTT GGA GAA TTT CCT CTC GGG
    Q   A   N   A   L   V   A   K   A   F   N   K  [C]  F   G   E   F   P   L   G
121 GAC GAT GAA ATG AAA GAA GTG AAG GAC AAA TCA ACT GTC CCA AGC TCA CAT AAT GCC AAA
    D   D   E   M   K   E   V   K   D   K   S   T   V   P   S   S   H   N   A   K
181 TGC CTC ATG GCG TGC ATG TTG AAA GAA GGG AGA ATT TTG AGG GGT GGG AAG TAC GAG TTA
   [C]  L   M   A  [C]  M   L   K   E   G   R   I   L   R   G   G   K   Y   E   L
241 GAG AAT GCA ATT TTG ATG GCC GAC GTA CTC AAC AAA AAT GAT CAT GCA GCA GCC GAC AAG
    E   N   A   I   L   M   A   D   V   L   N   K   N   D   H   A   A   A   D   K
301 GCG AAG CAG TTG ATC GAA ACG TGT GCT GCC CAA GTG GGT ACT GAC GCC AGC GCA GAC GAG
    A   K   Q   L   I   E   T  [C]  A   A   Q   V   G   T   D   A   S   A   D   E
361 TGC GAA TTC GCC TAC AAA ATG GCT CTT TGT GCC TCA GAT GAA GCT AAG AAG CTT GGA GTT
   [C]  E   F   A   Y   K   M   A   L  [C]  A   S   D   E   A   K   K   L   G   V
421 CGT CCG CCA GAT TTC TGA
    R   P   P   D   F   *
```

图 1 AlucOBP7 基因的核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of AlucOBP7 gene

下划线示推导的信号肽；方框内表示 6 个保守的半胱氨酸。The predicted signal peptide sequence is underlined; six conserved cysteins are boxed.

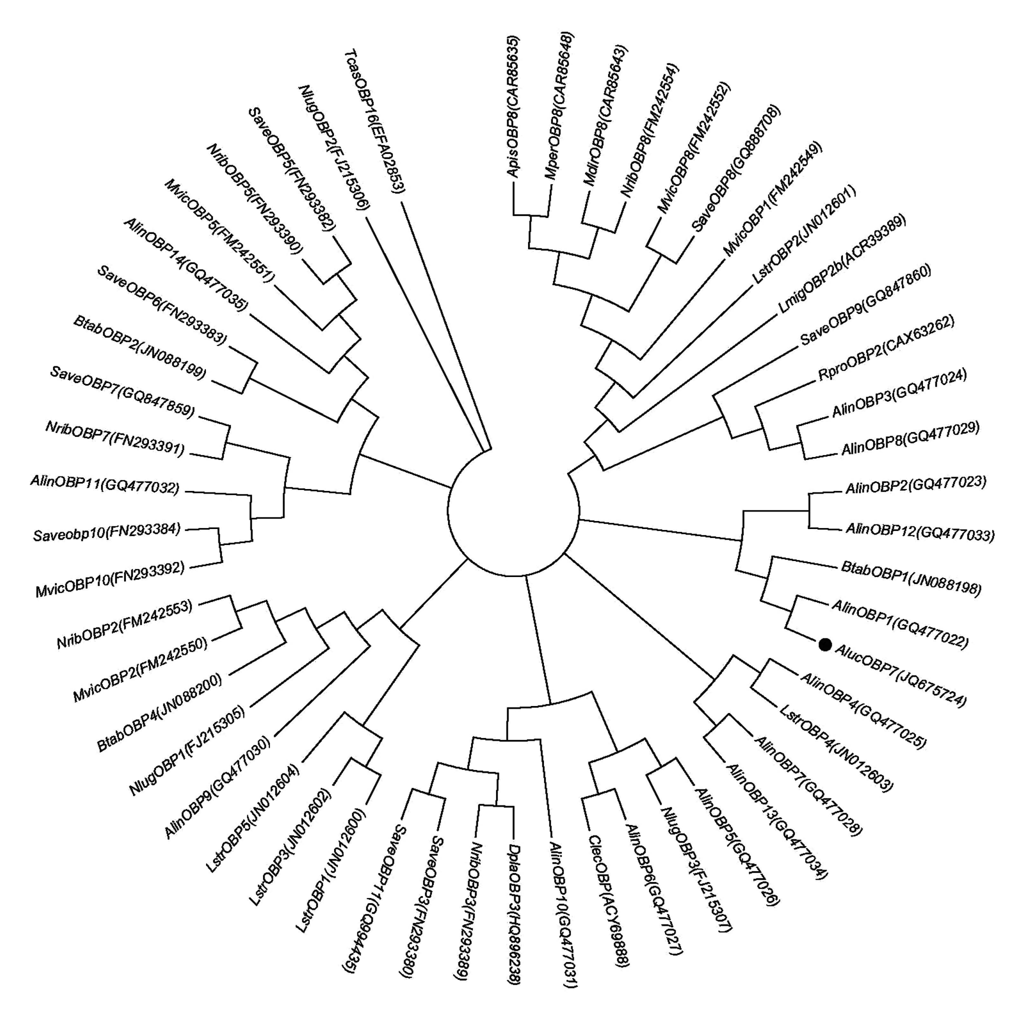


图 2　绿盲蝽气味结合蛋白 AlucOBP7 与其他昆虫 OBPs 的系统发育树

Fig. 2　Phylogenetic tree of AlucOBP7 and OBPs from other insects

气味结合蛋白的来源与 GenBank 登录号 The origin of the OBPs and their GenBank accession numbers are as follows：Aluc：绿盲蝽 *Apolygus lucorum* (AlucOBP7：JQ675724)；Alin：苜蓿盲蝽 *Adelphocoris lineolatus* (AlinOBP1：GQ477022；AlinOBP2：GQ477023；AlinOBP3：GQ477024；AlinOBP4：GQ477025；AlinOBP5：GQ477026；AlinOBP6：GQ477027；AlinOBP7：GQ477028；AlinOBP8：GQ477029；AlinOBP9：GQ477030；AlinOBP10：GQ477031；AlinOBP10：GQ477031；AlinOBP11：GQ477032；AlinOBP12：GQ477033；AlinOBP13：GQ477034；AlinOBP14：GQ477035)；Apis：豌豆蚜 *Acyrthosiphon pisum* (ApisOBP8：CAR85635)；Btab：烟粉虱 *Bemisia tabaci* (BtabOBP1：JN088198；BtabOBP2：JN088199；BtabOBP4：JN088200)；Clec：温带臭虫 *Cimex lectularius* (ClecOBP：ACY69888)；Dpla：枫长镰管蚜 *Drepanosiphum platanoidis* (DplaOBP3：HQ896238)；Lmig：东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis* (LmigOBP2b：ACR39389)；Lstr：灰飞虱 *Laodelphax striatella* (LstrOBP1：JN012600；LstrOBP2：JN012601；LstrOBP3：JN012602；LstrOBP4：JN012603；LstrOBP5：JN012604)；Mdir：麦无网长管蚜 *Metopolophium dirhodum* (MdirOBP8：CAR85643)；Mper：桃蚜 *Myzus persicae* (MperOBP8：CAR85648)；Mvic：巢菜修尾蚜 *Megoura viciae* (MvicOBP1：FM242549；MvicOBP2：FM242550；MvicOBP5：FM242551；MvicOBP8：FM242552；MvicOBP10：FN293392)；Nlug：褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (NlugOBP1：FJ215305；NlugOBP2：FJ215306；NlugOBP3：FJ215307)；Nrib：莴苣蚜 *Nasonovia ribis-nigri* (NribOBP2：FM242553；NribOBP3：FN293389；NribOBP5：FN293390；NribOBP7：FN293391；NribOBP8：FM242554)；Rpro：长红锥蝽 *Rhodnius prolixus* (RproOBP2：CAX63262)；Save：麦长管蚜 *Sitobion avenae* (SaveOBP3：FN293380；SaveOBP5：FN293382；SaveOBP6：FN293383；SaveOBP7：GQ847859；SaveOBP8：GQ888708；SaveOBP9：GQ847860；Saveobp10：FN293384；SaveOBP11：GQ994435)；Tcas：赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* (TcasOBP16：EFA02853)

β-石竹烯、月桂烯、金合欢烯、辛醛和 β-紫罗兰酮 8 种化合物均不能够和 AlucOBP7 有效结合，即使当这些气味分子的浓度达到 60 μmol/L 时，也仅能够使 AlucOBP7/1-NPN 复合物的荧光强度降低 10%～20%（图 5）。2-己酮能够与 AlucOBP7 有效结合，但结合能力一般，结合常数为 55.13 μmol/L。水杨酸甲酯与 AlucOBP7 蛋白表现出很强的结合能力，结合常数为 28.26 μmol/L。6 种盲蝽性信息素

表 1 气味标样与 AlucOBP7 蛋白的结合能力

Table 1 Binding affinities of ligands to AlucOBP7

气味标样 Ligands	结构式 Structural formula	IC_{50} (μmol/L)	Ki (μmol/L)
乙酸叶醇酯 *cis*-3-Hexenyl acetate		–	–
β-蒎烯 β-Pinene		–	–
橙花叔醇 Nerolidol		–	–
β-石竹烯 β-Caryophyllence		–	–
月桂烯 Myrcene		–	–
金合欢烯 Farnesene		–	–
辛醛 Octanal		–	–
β-紫罗兰酮 β-Ionone		–	–
2-己酮 2-Hexanone		63.53	55.13
水杨酸甲酯 Methylis salicylas		32.57	28.26
丁酸乙酯 Ethyl butyrate		35.24	30.58
丁酸丁酯 Butyl butanoate		45.24	39.26
己酸己酯 Hexyl hexanoate		41.27	35.81
4-氧代-反-2-己烯醛 4-oxo-(*E*)-2-hexenal		26.67	23.14
丁酸反-2-己烯酯 *Trans*-2-hexenyl-butyrate		–	–
丁酸己酯 1-Hexyl butanoate		–	–

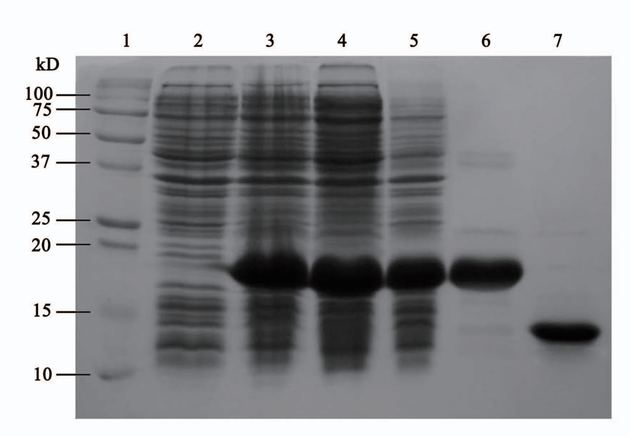


图 3　绿盲蝽 AlucOBP7 表达产物 SDS-PAGE 分析

Fig. 3　SDS-PAGE analysis of recombinant AlucOBP7

1：蛋白标准分子量 Protein molecular weight marker；2：pET/AlucOBP7 转化 BL21(DE3)未经 IPTG 诱导 The expressed product pET/AlucOBP7 non-induced by IPTG；3：pET/AlucOBP7 转化 BL21(DE3)经 IPTG 诱导 The expressed product pET/AlucOBP7 induced by IPTG；4：pET/AlucOBP7 转化 BL21(DE3)经 IPTG 诱导后的上清 The pellet of pET/ AlucOBP7；5：pET/AlucOBP7 转化 BL21(DE3)经 IPTG 诱导后的包涵体 The supernatant of pET/AlucOBP7；6：纯化后的 pET/AlucOBP7 融合蛋白 Purified AlucOBP7 protein with His-tag；7：经肠激酶切除 His-tag 后纯化的 AlucOBP7 蛋白 Purified AlucOBP7 protein without His-tag.

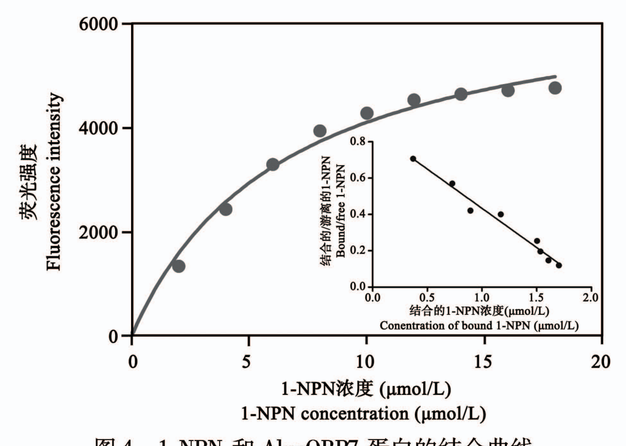


图 4　1-NPN 和 AlucOBP7 蛋白的结合曲线

Fig. 4　The binding curve of 1-NPN and AlucOBP7

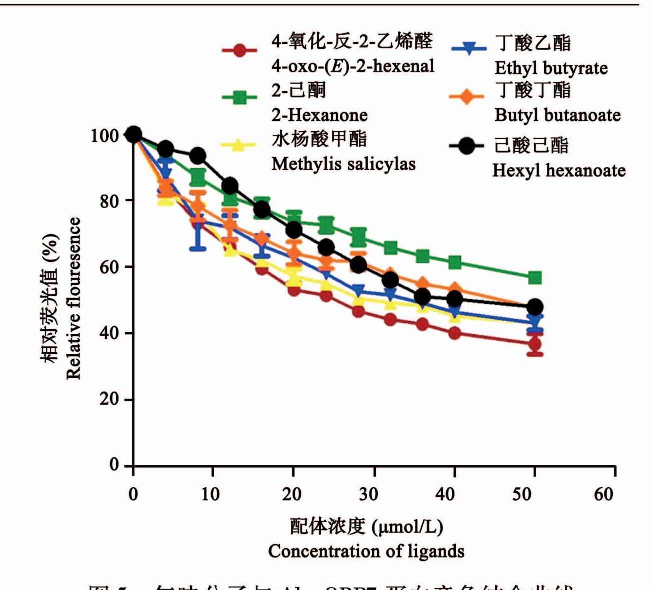


图 5　气味分子与 AlucOBP7 蛋白竞争结合曲线

Fig. 5　Competitive binding curves of ligands to AlucOBP7

类似物中的丁酸反-2-已烯酯和丁酸已酯均不能够和 AlucOBP7 有效结合，而丁酸乙酯、丁酸丁酯以及已酸已酯能够和 AlucOBP7 有效结合，结合能力中等，结合常数分别为 30.58，39.26 和 35.81 μmol/L。另外性信息素类似物 4-氧代-反-2-已烯醛和 AlucOBP7 具有较强的结合能力，结合常数为 23.14 μmol/L。

3　讨论

本文首次克隆和表达了绿盲蝽的一个新的气味结合蛋白 AlucOBP7，AlucOBP7 前端编码长为 18 个氨基酸的信号肽，具有气味结合蛋白的典型特征，序列中有 6 个保守的半胱氨酸位点。绿盲蝽 AlucOBP7 与其他 15 种已知昆虫化学感受蛋白序列比对和系统进化树结果显示，绿盲蝽 AlucOBP7 和苜蓿盲蝽 AlinOBP1 位于同一分支上，并且其氨基酸序列相似性达到 74.02 %，推测这两个基因来源于同一个祖先基因，但在长期进化过程中对不同类型环境化学因子刺激的适应和进化使其产生了分化，在不同物种间行使着相同或者某些类似的功能。

在 AlucOBP7 与 10 种棉花挥发物及 6 种盲蝽性信息素类似物荧光竞争结合测定中，AlucOBP7 能够选择性地与 2 种棉花挥发物和 4 种盲蝽性信息素类似物有效结合。植物挥发物中的 2-已酮是一种绿叶气味物质，也是棉花在自然条件下或者受到机械损伤时释放的挥发物(于惠林等，2007)，而水杨酸甲酯为花香气味物质和植物防御信号物质，这两种物质均为植物具有的基本物质，也是植食性昆虫定位寄主的基本物质(杜家纬，2001)。AlucOBP7 能够和 2-已酮及水杨酸甲酯有效结合，暗示该蛋白可能在绿盲蝽搜寻定位花期棉花植株过程中发挥感受功能，参与了绿盲蝽趋花转移危害寄主行为。金合欢烯是棉花受植食性昆虫取食危害后释放的挥发物(Loughrin *et al.*，1994；Ngumbi *et al.*，2009)，并且是整个挥发物中主要成分，但在本研究中与 AlucOBP7 几乎不结合，表明 AlucOBP7 对气味识别具有特异性。

4-氧代-反-2-己烯醛是绿盲蝽虫体组织提取物之一，绿盲蝽对其有触角电位(EAG)电生理反应，田间诱集试验证明该信息物对雄虫具有强烈引诱作用，是绿盲蝽性信息素的有效成分之一(张涛，2011)。在6种盲蝽性信息素类似物中，丁酸乙酯、丁酸丁酯以及己酸己酯能够和 AlucOBP7 有效结合，结合能力中等，4-氧代-反-2-己烯醛和 AlucOBP7 具有较强的结合能力，表明 AlucOBP7 参与绿盲蝽性信息素识别，特别是在雄虫寻找雌虫过程中发挥重要功能。有报道指出，丁酸己酯为雌性美国牧草盲蝽 *Lygus lineolaris* 在安静条件和受到惊扰时释放挥发物的主要成分，且雄性美国牧草盲蝽在安静条件和受到惊扰时释放的丁酸己酯量更高，说明丁酸己酯可能在美国牧草盲蝽寻找配偶进行交配和进行防御过程中发挥双重作用(Wardle *et al*., 2003)。然而本研究中性信息素类似物丁酸反-2-己烯酯和丁酸己酯与 AlucOBP7 的结合能力较差即不能有效结合，表明性信息素在不同物种间可能存在特异性。当然，绿盲蝽体内也可能存在其他气味结合蛋白参与识别结合丁酸反-2-己烯酯和丁酸己酯，这需要进一步展开相关工作。

目前研究认为性信息素结合蛋白 PBPs 在雌雄触角中都有可能存在，只是有量上的差异，因为雌虫触角中的 PBPs 也能够识别自身的信息素，或者至少能够识别自身信息素复合物的某些成分(Callahan *et al*., 2000)。我们前期研究发现，AlucOBP7 基因几乎全部在触角中表达，且雌雄触角中均有较高的表达量(Ji *et al*., 2013)。综合本文竞争结合实验和前期表达谱结果，我们推测 AlucOBP7 很可能是一个信息素结合蛋白 PBP。下一步通过 RNA 干扰等技术敲除绿盲蝽体内 AlucOBP7 基因，检测该基因被沉默后对绿盲蝽的电生理和求偶行为的影响将有助于全面解析该蛋白的气味结合特征。

综上所述，AlucOBP7 是一个重要的嗅觉蛋白，在绿盲蝽搜寻寄主和识别配偶可能扮演重要角色。同时，该蛋白也可能是一个潜在的作用靶标，可以尝试通过干扰其感受功能来控制盲蝽取食危害行为。

参考文献(References)

Ban L, Scaloni A, Brandazza A, Angeli S, Zhang L, Yan Y, Pelosi P, 2003. Chemosensory proteins of *Locusta migratoria*. *Insect Molecular Biology*, 12: 125 – 134.

Callahan FE, Vogt RG, Tucker ML, Dickens JC, Mattoo AK, 2000. High level expression of "male specific" pheromone binding proteins (PBPs) in the antennae of female noctuiid moths. *Insect Biochem. Mol. Biol*., 30(6): 507 – 514.

Du JW, 2001. Plant-insect chemical communication and its behavior control. *Acta Photophysiologica Sinica*, 27(3): 193 – 200. [杜家纬, 2001. 植物-昆虫间的化学通讯及其行为控制. 植物生理学报, 27(3): 193 – 200]

Feng L, Prestwich GD, 1997. Expression and characterization of a lepidopteran general odorant binding protein. *Insect Biochem. Mol. Biol*., 27(5): 405 – 412.

Gu SH, Wang SP, Zhang XY, Wu KM, Guo YY, Zhou JJ, Zhang YJ, 2011. Identification and tissue distribution of odorant binding protein genes in the lucerne plant bug *Adelphocoris lineolatus* (Goeze). *Insect Biochem. Mol. Biol*., 41(4): 254 – 263.

Gu SH, Zhang XY, Zhang YJ, Wu KM, Guo YY, 2010. Cloning and expression pattern analysis of an odorant binding protein gene *Alin-OBP*1 in the lucerne plant bug, *Adelphocoris lineolatus* (Goeze) (Hemiptera: Miridae). *Acta Entomologica Sinica*, 53: 487 – 496. [谷少华, 张雪莹, 张永军, 吴孔明, 郭予元, 2010. 苜蓿盲蝽气味结合蛋白基因 *Alin-OBP*1 的克隆及表达谱分析. 昆虫学报, 53: 487 – 496]

Gueldner R, Parrott W, 1978. Volatile constituents of the tarnished plant bug. *Insect Biochemistry*, 8: 389 – 391.

Ji P, Gu SH, Liu JT, Zhu XQ, Guo YY, Zhou JJ, Zhang YJ, 2013. Identification and expression profile analysis of odorant-binding protein genes in *Apolygus lucorum* (Hemiptera: Miridae). *Applied Entomology and Zoology*. doi: 10.1007/s13355-013-0188-0.

Krieger J, Nickisch-Rosenegk EV, Mameli M, Pelosi P, Breer H, 1996. Binding proteins from the antennae of *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol*., 26: 297 – 307.

Krieger J, Raming K, Prestwich GD, Frith D, Stabel S, Breer H, 2005. Expression of a pheromone-binding protein in insect cells using a baculovirus vector. *European Journal of Biochemistry*, 203(1 – 2): 161 – 166.

Krieger MJ, Ross KG, 2002. Identification of a major gene regulating complex social behavior. *Science*, 295(5553): 328 – 332.

Larsson MC, Domingos AI, Jones WD, Chiappe ME, Amrein H, Vosshall LB, 2004. *Or83b* encodes a broadly expressed odorant receptor essential for *Drosophila* olfaction. *Neuron*, 43 (5): 703 – 714.

Loughrin JH, Manukian A, Heath RR, Turlings TC, Tumlinson JH, 1994. Diurnal cycle of emission of induced volatile terpenoids by herbivore-injured cotton plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(25): 11836 – 11840.

Lu YH, Wu KM, Guo YY, 2007. Flight potential of *Lygus lucorum* (Meyer-Dür) (Heteroptera: Miridae). *Environ. Entomol*., 36(5): 1007 – 1013.

Maibèche-Coisne M, Longhi S, Jacquin-Joly E, Brunel C, Egloff MP, Gastinel L, Cambillau C, Tegoni M, Nagnan-Le Meillour P, 2001. Molecular cloning and bacterial expression of a general odorant-binding protein from the cabbage armyworm *Mamestra brassicae*.

European Journal of Biochemistry, 258(2): 768 – 774.

Nagnan-Le Meillour P, Huet JC, Maibeche M, Pernollet JC, Descoins C, 1996. Purification and characterization of multiple forms of odorant/pheromone binding proteins in the antennae of *Mamestra brassicae* (Noctuidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 26 (1): 59 – 67.

Ngumbi E, Chen L, Fadamiro HY, 2009. Comparative GC-EAD responses of a specialist (*Microplitis croceipes*) and a generalist (*Cotesia marginiventris*) parasitoid to cotton volatiles induced by two caterpillar species. *J. Chem. Ecol.*, 35(9): 1009 – 1020.

Pan HS, Zhao QJ, Zhao KJ, Zhang YJ, Wu KM, Guo YY, 2010. Application of electronic nose zNose™ for construction of volatiles fingerprint library and analysis of real time release rhythm of volatiles from damaged cotton. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 16: 468 – 473. [潘洪生，赵秋剑，赵奎军，张永军，吴孔明，郭予元，2010. 电子鼻 zNose™ 构建棉花挥发物指纹图谱及被害棉花挥发物释放节律分析. 应用与环境生物学报，16: 468 – 473]

Pelosi P, Zhou JJ, Ban LP, Calvello M, 2006. Soluble proteins in insect chemical communication. *Cell Mol. Life Sci.*, 63(4): 1658 – 1676.

Prestwich GD, 2008. Bacterial expression and photoaffinity labeling of a pheromone binding protein. *Protein Science*, 2(3): 420 – 428.

Qiao H, Tuccori E, He X, Gazzano A, Field L, Zhou JJ, Pelosi P, 2009. Discrimination of alarm pheromone (*E*)-β-farnesene by aphid odorant-binding proteins. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 39: 414 – 419.

Robertson H, Martos R, Sears C, Todres E, Walden K, Nardi J, 1999. Diversity of odourant binding proteins revealed by an expressed sequence tag project on male *Manduca sexta* moth antennae. *Insect Molecular Biology*, 8: 501 – 518.

Vogt RG, Callahan FE, Rogers ME, Dickens JC, 1999. Odorant binding protein diversity and distribution among the insect orders, as indicated by LAP, an OBP-related protein of the true bug *Lygus lineolaris* (Hemiptera, Heteroptera). *Chem. Senses*, 24 (5): 481 – 495.

Vogt RG, Riddiford LM, 1981. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature*, 293(5828): 161 – 163.

Wardle AR, Borden JH, Pierce HD, Gries R, 2003. Volatile compounds released by disturbed and calm adults of the tarnished plant bug, *Lygus lineolaris*. *J. Chem. Ecol.*, 29(4): 931 – 944.

Wu KM, 2007. Environmental impact and risk management strategies of Bt cotton commercialization in China. *Chinese Journal of Agricultural Biotechnology*, 4: 93 – 97.

Wu KM, Li WD, Feng HQ, Guo YY, 2002. Seasonal abundance of the mirids, *Lygus lucorum* and *Adelphocoris* spp. (Hemiptera: Miridae) on Bt cotton in northern China. *Crop Protection*, 21: 997 – 1002.

Yu HL, Zhang YJ, Pan WL, Guo YY, Gao XW, 2007. Identification of volatiles from field cotton plant under different induction treatments. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 18: 859 – 864. [于惠林，张永军，潘文亮，郭予元，高希武，2007. 田间条件下不同诱导棉花挥发性物质的鉴定. 应用生态学报，18: 859 – 864]

Zhang T, 2011. The Study of the Extraction, Identification and Application of Sex Pheromone Produced by *Apolygus Lucorum*. PhD Dissertation, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing. [张涛，2011. 绿盲蝽(*Apolygus lucorum*)性信息素的提取鉴定及应用研究. 北京：中国农业科学院博士毕业论文]

（责任编辑：赵利辉）